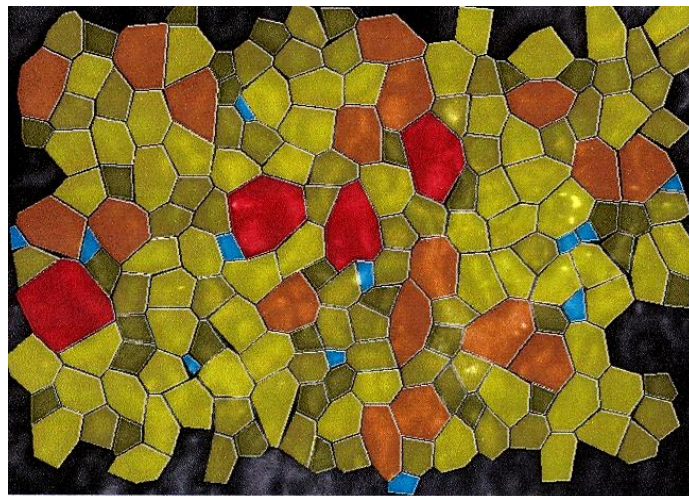


# **Estudio Comparativo entre Microscopía Confocal y Microscopía Especular en la valoración de endotelio en córneas con Distrofia de Fuchs**



Wissam Charafeddin  
Profesor Joaquim Barraquer  
Departamento de cirugía UAB  
Barcelona  
5 de Septiembre de 2010

# Índice

INTRODUCCIÓN.....	3
REVISIÓN Y ACTUALIZACIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	6
* El endotelio corneal.....	7
- El edema Corneal.....	9
* La distrofia de Fuchs.....	10
- Transmisión hereditaria y patogénesis.....	11
- Presentación clínica y diagnóstico diferencial.....	13
- Biomicroscopía.....	14
- Estadiaje clínico.....	16
* Pruebas para valoración del endotelio corneal.....	17
- Microscopía Especular.....	17
- Biomicroscopía confocal.....	20
HIPÓTESIS.....	25
OBJETIVOS.....	27
MATERIAL Y MÉTODOS.....	29
RESULTADOS.....	32
* Hallazgos encontrados por microscopía especular.....	33
* Hallazgos encontrados por microscopía confocal.....	34
DISCUSIÓN.....	38
CONCLUSIÓN.....	42
BIBLIOGRAFÍA.....	44

## **Introducción**

La distrofia endotelial de Fuchs es una enfermedad bilateral primaria lentamente progresiva, caracterizada por la disfunción y los cambios pleomórficos del endotelio corneal. Puede resultar en diferentes grados de edema epitelial y estromal causando dolor y disminución de la agudeza visual. Las guttas endoteliales son características de dicha distrofia y pueden ser observadas por varias técnicas.

La microscopía especular, introducida por la primera vez por Maurice en el año 1968, permite la observación en vivo del endotelio corneal con alta magnificación. Aunque esta técnica es extensamente usada en la valoración de casos con distrofia de Fuchs, algunos casos con edema estromal o con opacidad de medios no son valorables.

Desde el año 1989, es posible examinar el tejido corneal mediante microscopía confocal. El microscopio confocal tiene un diseño diferente a lo del microscopio especular y posibilita mejor visualización de las diferentes capas corneales. A pesar de tener una magnificación similar a la del microscopio especular, el microscopio confocal tiene mayor resolución. Fue usado en la evaluación de la cicatrización corneal después de la cirugía refractiva, identificación de patología corneal (por ejemplo, diferenciación entre queratitis herpética e infección por *Acanthamoeba*) y en el análisis de las células endoteliales (densidad celular, polymegatismo y pleomorfismo).

En el pasado, la información a cerca de dicha prueba era limitada en la práctica clínica por su coste y la dificultad técnica. En la clínica, se investiga la importancia de dicha técnica en la valoración del endotelio en corneas con

distrofia de Fuchs y se comparan los hallazgos encontrados por el Confoscan Nidek CS4 con los encontrados por microscopia especular sin contacto.

## **Revisión y actualización bibliográfica**

## **El endotelio corneal**

El mantenimiento de la hidratación y transparencia corneal depende de múltiples factores: la presión intraocular y la presión de imbibición estromal son fuerzas que promueven la acumulación de fluidos en el estroma. La evaporación de la película lagrimal y las bombas de transporte de iones a través de las membranas semipermeables del endotelio e epitelio disminuyen la presión osmótica del estroma y mantienen el equilibrio con las fuerzas que favorecen el edema (1).

El endotelio corneal es una monocapa de aproximadamente 400.000 células, de grosor 4-6  $\mu\text{m}$ , cubriendo la cara posterior de la cornea. Las células tienen una forma hexagonal y un tamaño de unos 20  $\mu\text{m}$  (2). Las células endoteliales son incapaces de replicarse por mitosis en adultos. Sin embargo, tienen la capacidad de extenderse y de mantener una fuerte unión con las células adyacentes para prevenir el paso de humor acuoso al estroma corneal. Son células activamente involucradas en la producción de energía y procesos de síntesis molecular, tienen un citoplasma con numerosas mitocondrias, un cuerpo de Golgi y un retículo endoplasmático elaborado que son característicos (1).

Se ha demostrado que el endotelio usa energía metabólica para transportar fluido desde el estroma hacia la cámara anterior. El transporte de bicarbonato desde el estroma hacia el humor acuoso es en suficiente cantidad para explicar el simultáneo paso isotónico de fluido. Posteriormente, el transporte de iones de sodio en la misma dirección fue deducido. Aunque el mecanismo de la regulación de la hidratación corneal no está del todo claro, está generalmente

aceptado que la función de la bomba de fluido endotelial corneal es el transporte de iones desde la córnea hacia el humor acuoso, esto resulta en un gradiente osmótico que aspira el fluido estromal evitando el edema corneal (3).

Desde el punto de vista clínico, la capa de células endoteliales es funcionalmente esencial a la córnea. Es una capa frágil cuya viabilidad es crucial para el suceso de cualquiera intervención intraocular. Las células endoteliales pierden la capacidad de dividirse a partir del nacimiento, pero como mencionado previamente, tienen mucha capacidad de extenderse para mantener una función que compensa las pérdidas celulares por el proceso de envejecimiento, las cirugías intraoculares y el traumatismo.

Al nacer, el ser humano, tiene una densidad celular endotelial que fluctúa entre 3500-4000 células por milímetro cuadrado (4), pero en corneas de los adultos, la densidad es entre 1400-2500 células/mm<sup>2</sup>. Las corneas transplantadas tienen menos que 1000 células/mm<sup>2</sup> (5), y mantienen su transparencia. Parece ser que mientras que dichas células pueden crecer para proporcionar una monocapa a la cara posterior de la membrana de Descemet, la función corneal normal puede mantenerse. Densidades menores de 400-700 células/mm<sup>2</sup>, pueden alterar la función endotelial y resultar en edema corneal y pérdida de agudeza visual, sin embargo, dado el rango de densidades celulares en corneas normales, existe poca correlación entre la función y la densidad endoteliales.

Según estudios por fluorofotometría, no se encontraron diferencias en la permeabilidad endotelial entre pacientes con guttas corneales avanzadas, guttas corneales leves y controles de la misma edad (6).



Según el estudio por McCartney, la densidad de las bombas de ATPasa localizadas en las paredes laterales de las células endoteliales están significativamente disminuidas en corneas distróficas (7).

En conclusión, una densidad corneal endotelial disminuida no es suficiente para causar edema corneal. Pero cuando la función barrera del endotelio está comprometida como ocurre en córnea guttata, el mecanismo de deshidratación corneal se altera y se acumulan fluido e iones en el estroma. Cuando la densidad celular está por debajo del valor crítico de 400-700 células/mm<sup>2</sup>, ocurre la descompensación endotelial con edema estromal progresivo e eventual edema epitelial. El edema estromal que se asocia con patologías endoteliales puede ocurrir en casos con densidades celulares más altas. Es probable que sea a consecuencia de la alteración de las vías paracelulares como en la distrofia de Fuchs. Cuando el endotelio está bajo estrés, se pierden algunas células. Las células restantes pueden perder la forma hexagonal típica y tener forma y tamaño irregulares. Estos cambios pueden ocurrir con la edad, después de traumatismo o con el uso crónico de lentes de contacto.

#### *Edema corneal:*

El edema corneal agudo secundario a glaucoma por ángulo cerrado o al uso de lentes de contacto, es a menudo reversible, mientras el edema corneal crónico es irreversible y su tratamiento depende de la enfermedad básica. El edema

crónico puede desarrollarse como consecuencia de disfunción endotelial como en casos de distrofia, inflamación o traumatismo.

El aumento de la permeabilidad o la disminución del transporte de iones o ambos pueden causar cambios en el tejido corneal. En casos leves, el engrosamiento corneal ocurre con inicialmente poca afectación visual. En casos avanzados, se manifiesta el edema epitelial; la acumulación de fluido entre o dentro las células epiteliales causa dispersión luminosa y distorsión de las imágenes por pérdida del aspecto liso de la superficie ocular lo que puede rápidamente disminuir la agudeza visual. En los estadios tardíos, surge la queratopatía bullosa con formación de bullas dolorosas. Si el curso natural no se interrumpe con queratoplastia, un pannus subepitelial eventualmente crece causando desaparición de las bullas y del dolor. La agudeza visual en este estadio es normalmente reducida a movimiento de mano por la cicatrización epitelial y estromal (8).

## **La distrofia de Fuchs**

Descrita por primera vez en el año 1910 por Ernest Fuchs. En su estudio, Fuchs presentó 13 casos de “opacidades corneales centrales bilaterales”. Estos cambios corneales eran más frecuentes en mujeres de edad avanzada y no se asociaban con inflamación previa. Vogt se refirió a los cambios precoces en el endotelio corneal como “guttas”. Estudios ultraestructurales demostraron

después que los cambios patológicos del epitelio eran secundarios a las alteraciones del endotelio y no formaban parte de la enfermedad primaria (9).

La Distrofia de Fuchs es una anomalía corneal hereditaria autosómica dominante bilateral de la córnea, normalmente asimétrica que aparece más frecuentemente en mujeres mayores de 40 años y progresa lentamente. Esta distrofia que afecta al endotelio, resulta en varios grados de edema epitelial o estromal que causa dolor y disminución de la agudeza visual.

#### *Transmisión hereditaria y patofisiología*

En 1978, Krachmer describió 64 familias con distrofia corneal de Fuchs, explorando 228 familiares y encontrando un patrón consistente con herencia autosómica dominante (10). Resultados similares fueron descritos por Rosenblum en 1980 (11).

Mientras no todos los pacientes con distrofia de Fuchs están conscientes de historia familiar de la enfermedad, es posible que algunos casos esporádicos sean la primera presentación en una familia con individuos con enfermedad subclínica. Fue demostrado que la transmisión de 2 diferentes genotipos a un individuo puede acelerar la aparición de la enfermedad.

#### *- Familias con aparición temprana de la distrofia*

En 1979, Magovern describió una familia con cornea guttata en la cual la inherencia era autosómica dominante. Sin embargo, en vez de la predominancia en mujeres de edad avanzada, afectaba igualmente a mujeres y varones de

edades, en la mayoría de los casos, menores de 40 años (12). Estudios 25 años más tarde demostraron mutaciones en el gen Col8A2. Esta entidad denominada distrofia corneal de Fuchs de aparición temprana representa una enfermedad diferente de la distrofia de aparición tardía descrita por Fuchs por los hallazgos encontrados por la histología y estudios de inmunohistoquímica corneales.

- Distrofia de Fuchs de aparición tardía

Hasta la fecha, 4 locus cromosomales y una mutación genética fueron implicados con la enfermedad:

FCD 1	13pTel-13q12.13
FCD 2	18q21.2-q21.32
FCD 3	5q33.1-q35.2
FCD 4	9p

En todos los casos clínicos de distrofia de Fuchs de aparición tardía, las anomalías estructurales de la membrana de Descemet están presentes y son distintos de los que se pueden encontrar en corneas con la entidad de aparición temprana o corneas normales.

La pérdida de la función endotelial corneal en dicha distrofia puede ser secundaria a cambios a nivel de la membrana de Descemet o por fallo primario de las células endoteliales (8).

Está demostrado que la densidad celular endotelial en pacientes afectados está significativamente reducida. La disminución prematura de la densidad celular endotelial puede ser causada por la aumentada susceptibilidad al estrés oxidativo y la apoptosis. Una investigación en corneas afectadas usando el

“serial analysis of gene expression” (SAGE) demuestra una disminución significativa de la expresión de algunos genes asociados con la oxidación y apoptosis consistente con la reducida tolerancia de las células endoteliales al daño asociado a la oxidación. El análisis por SAGE también encontró una expresión alterada de los genes importantes en la función de las bombas endoteliales (13).

#### *Presentación clínica y diagnóstico diferencial*

Las guttas o excrecencias endoteliales se consideran el hallazgo principal de la enfermedad. La distrofia de Fuchs debuta como guttas corneales centrales primarias, una condición común en gente mayor en la cual la córnea se queda transparente y sin edema durante toda la vida. Ocasionalmente, estas guttas progresan y causan descompensación endotelial e hidratación corneal. En este estadio, se puede diagnosticar la condición como distrofia endotelial de Fuchs. Los pacientes afectados de distrofia de Fuchs en un ojo normalmente tienen guttas avanzadas en el ojo contralateral. La probabilidad de descompensación corneal es mayor en estos ojos por la progresión a edema corneal en el ojo contralateral (14).

Las guttas de la distrofia de Fuchs se pueden confundir con los corpúsculos de Hessel-Henle que tienen una estructura similar a las guttas pero existen en la periferia de casi todas las córneas a partir de cierta edad y nunca evolucionan hacia edema corneal. Las guttas secundarias o pseudoguttas también se

incluyen en el diagnóstico diferencial y aparecen después de inflamación secundaria a trauma, toxinas o infecciones. Otras condiciones que hay que tener en cuenta en el diagnóstico diferencial: La keratitis disciforme que se asocia con inflamación, la keratopatía bullosa pseudofáquica después de una extracción de catarata, la distrofia posterior polimorfa y el edema corneal glaucomatoso (9,15).

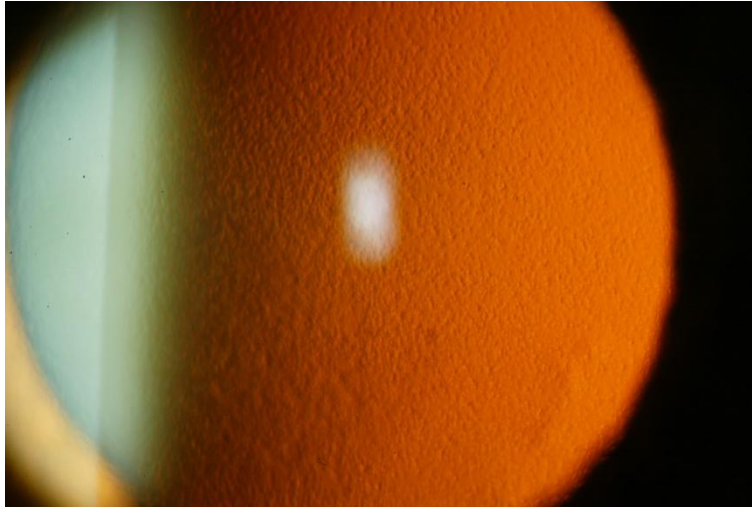
### *Biomicroscopía*

El examen biomicroscópico se realiza en asociación con luz de lámpara de hendidura. Existen múltiples técnicas de iluminación que permiten poner en evidencia las patologías corneales.

Por iluminación directa focal se puede apreciar el endotelio en distrofia de Fuchs por reflexión especular. Sólo diferencias angulares de 30°-40° entre la fuente luminosa y el biomicroscopio permiten de observar las 2 caras de la córnea en separado.

Se puede también explorar el endotelio por la técnica de iluminación indirecta. En esta situación, la luz no está dirigida directamente al tejido que queremos examinar sino está transmitida a través de los tejidos. Por ejemplo, la iluminación límbica permite de poner en evidencia precipitados corneales endoteliales. La retroiluminación es el tipo de iluminación indirecta más utilizada. Si esta proviene del iris, nos da detalles del endotelio y membrana de Descemet como los pliegues, los precipitados retro-descemeticos y nos permite la visualización de las excrecencias posteriores de la membrana de Descemet en

casos de distrofia de Fuchs. Estas son aún más visibles cuando la retroiluminación proviene de la retina después de la dilatación pupilar (*Fig.1*) y cuando los ejes del biomicroscopio y la fuente luminosa están alineadas (16).



*Fig. 1* Guttas endoteliales observadas por retroiluminación mediante lámpara de hendidura

La superficie posterior de la córnea está cubierta por guttas en múltiples estadíos. Estos se ven como indentaciones en forma de puntos que se pueden asociar con puntos de pigmentación. Las guttas aparecen primero en la zona central progresando posteriormente hacia la periferia más horizontalmente que verticalmente. Cuando la enfermedad progresa, la membrana de Descemet se engrosa y las guttas adquieren la apariencia de metal batido. El edema estromal temprano presenta una neblina gris anterior a la membrana de Descemet y posterior a la capa de Bowman. En los estadíos tempranos, el edema corneal difuso aparece como vidrio esmerilado interrumpido por múltiples zonas de fluido (9).

### *Estadiaoje clínico*

El curso clínico de la distrofia de Fuchs se divide en 4 estadios que pueden requerir dos a tres décadas para desarrollarse.

*Estadio 1:* El paciente es asintomático, pero en la biomicroscopía se aprecian guttas corneales centrales con pigmentación variable en la superficie posterior de la córnea y engrosamiento de la membrana de Descemet sin edema de la cornea. Este estadio es indistinguible de las guttas benignas sin edema corneal.

*Estadio 2:* Se caracteriza por disminución indolora de la visión y niebla particularmente severa por la mañana al despertarse. Estos síntomas son secundarios a los grados variables de edema a nivel del estroma y epitelio. La disminución de la evaporación de la lágrima durante el sueño disminuye su osmolaridad y resulta en edema y disminución de la agudeza visual al despertarse. Con tinción fluoresceínica de la lágrima, las células epiteliales hinchadas se ven como puntos negros en la superficie de la córnea. Las guttas son abundantes y las células endoteliales tienen forma y tamaño variables.

*Estadio 3:* Formación de bullas epiteliales y subepiteliales que se rompen causando dolor. Se nota edema corneal difusa de la córnea adoptando aspecto de vidrio esmerilado. La membrana de Descemet, que es inelástica, se empuja posteriormente por la hidratación estromal formando estrías y pliegues.

*Estadio 4:* La mayoría de los ojos se intervienen quirúrgicamente antes de llegar a este estado. Se caracteriza por cicatrización subepitelial, las erosiones epiteliales son menos frecuentes y la neovascularización superficial puede



ocurrir. La agudeza visual puede ser muy disminuida aunque el paciente no nota episodios de dolor. El tejido fibroso disminuye la formación de bullas que pueden causar dolor al romperse pero afecta gravemente la visión (15).

## **Pruebas para valoración del endotelio corneal**

### *Microscopía Especular*

La microscopía especular endotelial consiste en observar la luz reflejada por una superficie celular iluminada por un rayo de luz emitido por una fuente en el microscopio. Para llegar al endotelio, el rayo incidente tiene que atravesar múltiples capas desde la película lagrimal hasta la capa de células endoteliales. Estas capas son transparentes en la corneas en estado normal. La calidad de imagen por microscopía especular depende de la cantidad de luz reflejada a nivel de las diferentes interfases del camino transcurrido. Existen 3 interfases que tienen un papel óptico determinante: La interfase entre el objetivo del microscopio y la película lagrimal, la interfase entre la lagrimal y el epitelio corneal y la tercera interfase entre el endotelio y el humor acuoso. En cada una de las interfases, una parte de la luz esta reflejada en modo especular (hacia el microscopio), la otra parte continua su camino a través de la cornea. Cuando más diferencia existe entre los índices de refracción de las diferentes capas, más será la reflexión luminosa. Además de estas reflexiones, la luz dispersada por las opacidades o irregularidades encontradas por el rayo incidente interviene

en la formación de la imagen. Esta luz dispersa altera la imagen endotelial y en casos de edema estromal corneal, puede mascarar totalmente la imagen.

En el estado normal, la mosaica corneal endotelial tal como puede ser observada en un paciente joven está constituida de células perfectamente hexagonales con límites bien definidas, relativamente finas y rectilíneas. Con la edad, el tamaño de las células aumenta y estas tienden a perder la forma hexagonal. Esta acentuación del pleomorfismo, que es la variación de las formas de las células, está causada por la pérdida de la regularidad de los ángulos entre las paredes de las células endoteliales. La diferencia de tamaño de las células endoteliales (definida como polimegatismo) causada por la variación de la longitud de las paredes de las células endoteliales, se asocia frecuentemente con el aumento del pleomorfismo. El aumento de dichos parámetros no necesariamente se asocia con la alteración sistémica de la función endotelial que es de mantener la deturgencia corneal pero mayores aumentos del tamaño celular indican disminución de la densidad celular con posible riesgo de edema corneal (14).

La microscopía especular del endotelio de los pacientes con distrofia de Fuchs es posible sólo cuando el engrosamiento estromal no es muy significativo (9, 14,15). Las superficies irregulares a nivel del endotelio corneal reflejan la luz de manera alterada. En casos de excrecencias, la luz reflejada en el vértice está recibida por el microscopio y da lugar a una imagen clara mientras que las pendientes dispersan la luz fuera del campo del microscopio y no son visibles en las fotografías obtenidas (14). Por lo tanto, las guttas endoteliales aparecen

como zonas oscuras con centro blanco (Fig.2). Tienen una forma oval o redondeada debido a la interrupción del reflejo especular, sin que necesariamente falten las células en su cara posterior (15).

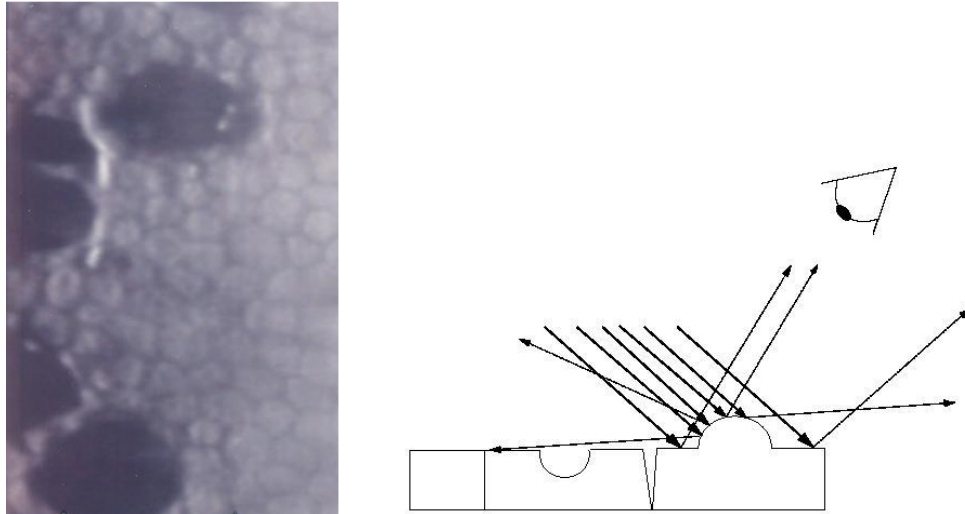


Fig. 2 Las pendientes de las excrescencias endoteliales reflejan la luz fuera del campo del microscopio. En la imagen resultante, las guttas endoteliales aparecen como zonas oscuras con un centro blanco.

La disminución de la densidad de células endoteliales es característica en ojos con guttas corneales centrales o distrofia de Fuchs. El edema corneal ocurre más frecuentemente cuando la densidad celular es menor de 1000 células/mm<sup>2</sup>. En estos casos, la capa de células endoteliales es discontinua e incompleta. Sin embargo, como mencionado previamente, se puede encontrar corneas claras en pacientes con recuento celular entre 500-1000 células/mm<sup>2</sup>.

Cualitativamente, los hallazgos en la cara posterior de la córnea fueron clasificados en 5 estadios:

*Estadio 1:* Guttas aisladas de tamaño inferior a lo de una célula endotelial.

*Estadio 2:* Guttas aisladas de tamaño cerca de una célula endotelial

*Estadio 3:* Las guttas empiezan a coalescer, las células endoteliales alrededor de las guttas son anormales mientras que las células localizadas a distancia mantienen su forma normal.

*Estadio 4:* Guttas confluentes dando una imagen multilobulada con múltiples reflejos claros.

*Estadio 5:* Ninguna célula y ningún contorno celular visible (17).

Cuando hay edema corneal, es difícil la valoración del endotelio corneal por microscopía especular a causa de la luz irregular reflejada por las capas corneales anteriores al endotelio. En estos casos, se puede explorar el endotelio con microscopía confocal (14).

#### *Biomicroscopía confocal*

Al contrario que la biomicroscopía que examina la córnea en una sección óptica perpendicular a la misma, el microscopio confocal tiene un diseño en el cual sólo la zona del plano focal contribuye a la imagen, y la luz originada fuera del objeto enfocado es eliminada. Esto permite la exploración *en vivo* de las diferentes capas de la córnea sin la presencia de rayos de luz dispersos que pueden bajar la calidad de la imagen.

El microscopio confocal fue descrito por primera vez en el año 1940 por Goldmann. En el año 1985, se publicaron las primeras imágenes de cornea humana con dicho microscopio. En las décadas siguientes, los conocimientos de

la córnea se profundizaron significativamente con el desarrollo de dicha técnica y su aplicación en vivo.

La microscopía confocal en vivo da imágenes en serie en forma de secciones ópticas a través del entero espesor corneal. Por ser una técnica no-invasiva, permite la valoración rápida de la córnea en su estado fisiológico evitando artefactos asociados con el estudio ex vivo.

En adición a la información cualitativa, la microscopía confocal permite también el análisis cuantitativo de las capas, nervios y células de la córnea (14).

La calidad de imagen por el microscopio convencional puede ser limitada por las reflexiones y la dispersión luminosa de las estructuras fuera del plano focal en estudio.

El microscopio confocal permite evitar tal inconveniente usando el principio de confocalidad. En su forma más sencilla, la luz se emite desde una fuente luminosa a través de un agujero estenopéico y se enfoca sobre el tejido con una lente objetiva. La luz reflejada a nivel del punto de foco del espécimen está reunida por una lente paralela y enfocada sobre un agujero separado donde se recibe por un detector. El punto de iluminación de la fuente y el agujero de observación están ambos enfocados sobre el mismo foco del tejido en estudio, de donde viene el nombre confocal. La luz que se origina desde el punto focal se detecta eficientemente porque la imagen de dicho punto de enfoque está enfocada en la apertura del detector (*Fig.3*). Sin embargo, solo una pequeña proporción de la luz emitida desde focos adyacentes en frente y detrás del plano focal se detecta por estar fuera del margen de detección (18,19).

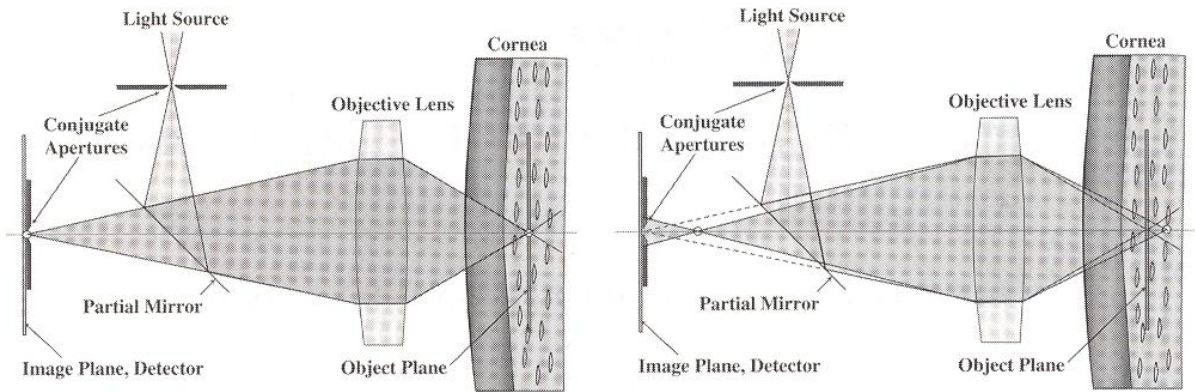


Fig.3 Principios de la microscopía confocal. (Izquierda) La luz reflejada desde el punto focal del espécimen está enfocada con la apertura del detector (confocalidad). (Derecha) La luz proveniente del tejido adyacente al punto focal no está enfocada en la apertura del recipiente y no se detecta (19).

Este diseño permite una mejor resolución axial y mejor resolución lateral comparada con microscopios convencionales. Los microscopios confocales de uso clínico tienen, según el diseño, una profundidad de campo de 10-26  $\mu\text{m}$  y una resolución lateral de 1-2  $\mu\text{m}$  (19).

El principio confocal puede ser limitado a un punto focal o bien, como en otros diseños, a una hendidura en el plano focal. El microscopio confocal en hendidura tiene el mismo concepto pero las aperturas en estenopéico de excitación y detección están sustituidas por un par de hendiduras estrechas.

En la práctica existen 3 tipos de microscopio confocal:

- 1) El Tandem Scanning Confocal Microscope (TSCM): utiliza múltiples agujeros estenopéicos que permiten una excelente resolución lateral e axial y una profundidad de campo estrecha.
- 2) El Slit-scanning Confocal microscope: Como el Nidek CS 4 usa una apertura en forma de hendidura vertical para iluminación y observación

del campo. El grosor de la hendidura (300  $\mu\text{m}$  para el CS4) aumenta la emisión luminosa lo que permite mejor contraste y claridad que el TSCM pero a expensas de una profundidad de campo aumentada.

- 3) Laser scanning Confocal Microscope (LSCM): Como el HRT, incorpora ópticas de laser HRT (19).

Este aparato es capaz de valorar la córnea de manera cualitativa, las imágenes de mejor calidad se obtienen con el LSCM y el SSCM. Los cambios morfológicos de las células, la presencia de hongos u otros microorganismos pueden ser detectados aunque la interpretación varía entre los observadores. También es posible examinar la córnea cuantitativamente, como medir el grosor corneal, profundidad de las interfases quirúrgicas, densidad estromal, de células endoteliales o de nervios y la dispersión de luz a diferentes profundidades.

Se puede examinar el endotelio corneal por microscopía especular, microscopía electrónica y microscopía óptica. Mientras, la microscopía especular es normalmente inefectiva en la visualización del endotelio en casos de edema corneal, la histopatología por microscopio electrónico únicamente es útil *in vitro*. El microscopio confocal, en cambio, permite la exploración del endotelio *in vivo* incluso en casos de edema corneal (20,21,22,23,24).

Por el microscopio confocal, el endotelio normal consiste en células hexagonales reflectivas de forma regular. Los núcleos de las células no son visibles. Los bordes celulares reflejan menos luz que el citoplasma lo que resulta en una red de bordes celulares oscuros entre áreas de hiperreflectividad citoplasmática. El

recuento de células endoteliales se puede valorar y es comparable con los resultados de microscopía especular.

En los casos de córnea guttata o Distrofia de Fuchs, las guttas aparecen como imágenes hiporefectivas redondas con un reflejo central ocasional a nivel del endotelio, las guttas están rodeadas por células endoteliales. Se evidencia también una disminución del recuento de células endoteliales con pleomorfismo y polimegatismo (20, 21,22).

El edema corneal puede asociarse con bullas en la capa epitelial basal. La capa de Bowman anómala presenta hiperreflectividad difusa en ausencia de nervios. En el estroma, se aprecian lagunas y bandas oscuras con fondo hiperreflectivo. La membrana de Descemet, que no es visible en pacientes jóvenes (23), parece engrosada con reflexión acelular difusa entre el estroma posterior y el endotelio (21).



## **Hipótesis**

El Microscopio confocal tiene un diseño específico en lo cual la mayoría de la luz reflejada desde el tejido corneal adyacente al plano objetivo está eliminada dando imágenes más claras que las obtenidas por microscopía especular. Este microscopio puede ser más útil en la evaluación del endotelio corneal en pacientes con edema corneal u opacidades estromales secundarias a la distrofia de Fuchs. La densidad de células endoteliales obtenida por ambas pruebas en corneas normales parece comparable si se realizan las imágenes en las mismas zonas corneales.

## **Objetivos**

El objetivo de este estudio es comparar cualitativamente la capa de células endoteliales por ambas pruebas y describir los hallazgos encontrados. También se pretende comparar cuantitativamente el número de células endoteliales por ambas pruebas en pacientes normales y pacientes con distrofia de Fuchs.

## **Material y métodos**

Es un estudio prospectivo en el cual se comparan dos pruebas: el microscopio confocal y el microscopio especular en la valoración del endotelio corneal en pacientes diagnosticados de Distrofia de Fuchs y pacientes normales

Se escogen 10 ojos (5 pacientes) normales y otros 15 ojos (8 pacientes) diagnosticados previamente de distrofia de Fuchs sin descompensación y se llaman para valorar el estado del endotelio por dos técnicas diferentes: el microscopio confocal y el microscopio especular.

Los pacientes con distrofia de Fuchs elegidos tenían una edad comprendida entre 33 y 76 años, algunos habían hecho las pruebas en el pasado, otros fueron llamados para hacer los estudios de la córnea central por microscopía confocal y microscopia especular. Estos ojos fueron comparados con 10 ojos de pacientes normales.

Antes de las pruebas, valoramos la AV de cada paciente por optótipos de Snellen y examinamos la córnea mediante lámpara de hendidura. Luego medimos la tensión intraocular en los ojos afectados.

Después de la valoración clínica, se hace el recuento celular mediante el microscopio especular sin contacto tipo Topcon. El paciente se sienta en frente del microscopio especular, una vez alineado el microscopio con su córnea central, se toman las fotos del endotelio central, calculando posteriormente la densidad central de las células.

A continuación, examinamos los ojos por el Confoscan Nidek CS 4, se aplica primero anestésico local en los ojos para valorar y se sienta al paciente con la barbilla aplicada en frente del confoscan, se aplica gel en el ojo y luego se aplica

una lente de magnificación 40x sobre la córnea. Se toman las fotografías en la zona central de la córnea cuando el paciente está mirando de frente y seguidamente se hace de manera automática el recuento celular endotelial.

Después de la valoración de la córnea con los dos microscopios, se realiza paquimetría ultrasónica de las córneas examinadas.

Finalmente, se analizan las fotos tomadas mediante ambas pruebas.

## **Resultados**



En la muestra de pacientes con distrofia de Fuchs, 7 de los pacientes valorados eran mujeres, lo que constituye un 88% de los pacientes. Mientras que había sólo un varón en la muestra.

Todos los pacientes de la muestra tenían guttas observadas en el examen mediante la lámpara de hendidura y todos fueron diagnosticados en el pasado de distrofia endotelial de Fuchs. Ninguno de los pacientes refería dolor o descompensación severa de la córnea. Únicamente una paciente fue intervenida de queratoplastia penetrante en el ojo contralateral hace 18 meses. Los pacientes de la muestra tenían una agudeza visual con corrección (AVcc) media de 0.65 (desviación típica de 0.21). La paquimetría media de estos ojos era de 625,2  $\mu\text{m}$  (desviación típica de 61.4  $\mu\text{m}$ ).

Los pacientes incluídos en el grupo control fueron elegidos de manera randomizada; presentaban edades comprendidas entre 51 y 77 años. Todos los ojos controles tenían AVcc entre 0,8 y 1 excepto un ojo que era ambliope y paquimetria dentro de la normalidad (554  $\mu\text{m} \pm 33 \mu\text{m}$ ). Ninguno de los ojos controles presentaba ningún tipo de patología ocular que pudiera perjudicar a la córnea o al recuento celular endotelial corneal.

### **Hallazgos encontrados por microscopia especular:**

En 3 de los ojos con distrofia de Fuchs (20%), no se ha podido valorar cualitativamente el endotelio por microscopía especular a causa del edema corneal y la opacidad de medios. En un ojo no se observaron células ni

contornos celulares claros y fue clasificado como estadio 4 o 5 según la clasificación de Laing (17), 9 de los ojos (60%) tenían guttas confluentes de forma multilobulada (estadio 4), 2 ojos fueron clasificados en estadio 3 con guttas que empiezan a juntarse y células de aspecto normal en partes lejanas de las guttas. Finalmente, un ojo fue clasificado dentro del estadio 2 con guttas aisladas y células de forma y tamaño dentro de la normalidad.

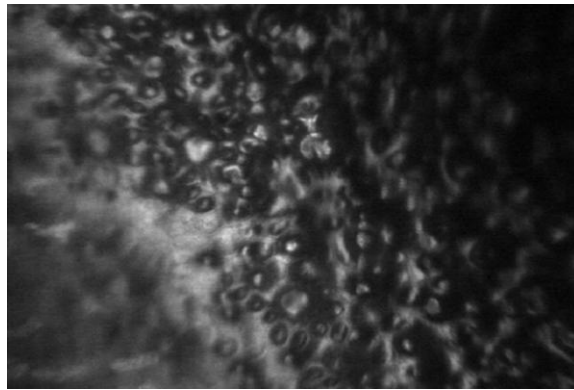
No se pudo valorar la densidad celular endotelial en los pacientes de la muestra de distrofia de Fuchs excepto en uno de los pacientes que estaba en el estadio 2, en el cual la densidad era de 1612 células por  $\text{mm}^2$ . En este paciente, se valora el número de células endoteliales hexagonales que era del 52 % (el valor normal es superior a 60 %).

Los ojos controles mostraban células endoteliales de aspecto normal y sólo se encontraron guttas en un paciente (2 ojos), siendo éstas aisladas y de tamaño equivalente a una o 2 células endoteliales. El recuento celular endotelial medio de los ojos control fue de 2404 célula / $\text{mm}^2$  con una desviación típica de 273 células/ $\text{mm}^2$  y el porcentaje de células de forma hexagonal tenía una media de 62% (desviación típica de 10.3%).

### **Hallazgos encontrados por microscopia confocal:**

Por Confoscan, se pudo valorar el endotelio en todos los ojos diagnosticados de distrofia de Fuchs. Además, por confoscan, se valoraron todas las capas de la cornea anteriores a la capa de células endoteliales.

En el 100% de los ojos patológicos examinados, se pudo valorar el endotelio y detectar la presencia de guttas en la cara posterior de la cornea. Las guttas aparecieron como zonas oscuras con reflejo blanco de la luz, rodeadas de células endoteliales dando un aspecto de fresa (*Fig.4*). En 4 de los 15 ojos examinados se apreció la presencia de pigmento en el endotelio.

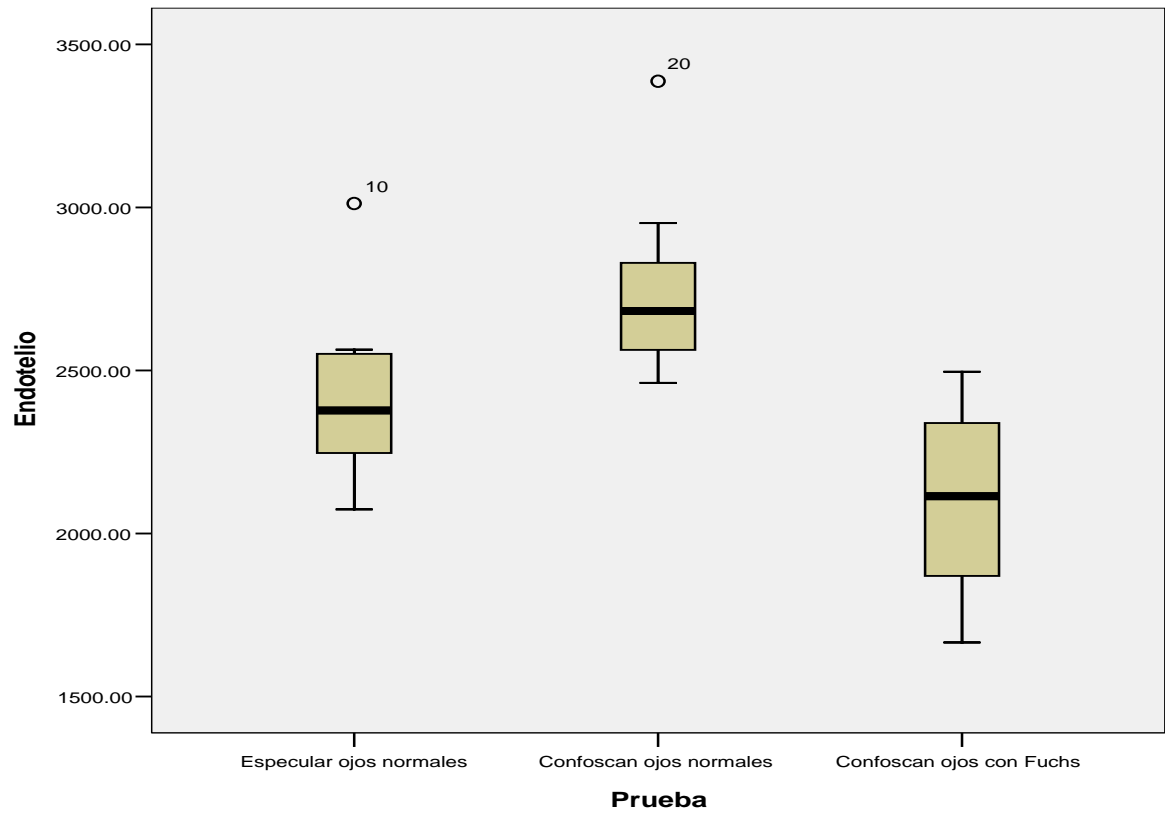


*Fig.4* Aspecto de fresa del endotelio valorado por el microscopio Confocal

Al contrario que en el microscopio especular, con el confoscan se pudo calcular la densidad celular endotelial de los ojos con distrofia de Fuchs. La densidad media de células fue de 2110 células/mm<sup>2</sup> (desviación típica de 269 células/mm<sup>2</sup>) siendo el valor más bajo de 1666 células/mm<sup>2</sup>. Las células endoteliales han mostrado pleomorfismo y polimegatismo y el porcentaje de células endoteliales manteniendo forma hexagonal normal apreciado en los ojos con distrofia de Fuchs era de 36% (desviación típica de 7%).

Los pacientes normales examinados tenían buen aspecto de la capa endotelial, el recuento celular medio era de 2745 células/mm<sup>2</sup> (desviación típica de 274.5 células/mm<sup>2</sup>). Se aplicó la prueba de Mann-Whitney para comparar las medias de densidad celular obtenidas mediante las dos pruebas en pacientes normales y se observó que la diferencia era estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ). Se realizó la comparación de medias de densidad celular endoteliales obtenidas por Confoscan entre los dos grupos: los ojos normales y los ojos con la distrofia y se apreció una diferencia estadísticamente significativa por la prueba de Mann-Whitney ( $p < 0.05$ ).

Por Confoscan, se pudieron valorar también las capas anteriores de la córnea de los pacientes. En 5 de los 15 pacientes valorados, se pudo apreciar hiperreflectividad anómala de los bordes de células basales del epitelio que pueden demostrar un estadio precoz de edema intraepitelial. No se pudo valorar la presencia de bullas intraepiteliales de queratopatía bullosa.



Representación gráfica de las densidades de células endoteliales en córneas normales y córneas con distrofia de Fuchs por microscopía especular y microscopía confocal. No se pudo valorar recuento celular por microscopía especular en ojos con distrofia de Fuchs.

## **Discusión**

En este estudio, hemos comparado los resultados obtenidos en pacientes con distrofia de Fuchs y pacientes con córneas normales mediante dos pruebas: la microscopía confocal y la microscopía especular.

En las córneas normales, ambas pruebas eran igualmente útiles en la valoración del endotelio con resultados cualitativos similares. Sin embargo, en contraposición a estudios previos (24,25,26,27), se ha demostrado que la densidad de células endoteliales por estas dos pruebas era estadísticamente diferente, obteniendo en 9 de los 10 casos estudiados, valores superiores por microscopio confocal; este resultado es poco fiable porque el número de ojos estudiado era pequeño (10 ojos). Según el estudio realizado por Hara *et al.* en el año 2003, se pueden usar ambas pruebas para la valoración del endotelio de córneas normales donde la superficie posterior de la córnea es lisa a pesar de las diferencias ópticas de estas pruebas. Pero cuando hay guttas e irregularidades de la córnea posterior, el Confoscan se ha demostrado superior al microscopio especular (24). De hecho, el primer estudio que ha demostrado mejores resultados con el confoscan en córneas edematosas fue publicado por Kaufmann *et al.* en el año 1993 (22).

En este estudio también se pone de manifiesto los mejores resultados obtenidos por confoscan en los pacientes con distrofia de Fuchs. Con el confoscan, se podía ver el aspecto de las guttas y células endoteliales más claramente que con el microscopio especular, además se podía calcular la densidad de las células endoteliales en todos los pacientes afectados mientras que con el microscopio especular solo se podía valorar la densidad de estas células en un solo ojo con

la distrofia de Fuchs. Esta paciente tenía la enfermedad poco avanzada (estadio 2 según la clasificación de Laing *et al.*) en ambos ojos con densidad disminuida de guttas. La densidad de las células endoteliales por Confoscan y microscopía especular en este ojo era comparable (1790 células/mm<sup>2</sup> y 1615 células/mm<sup>2</sup> respectivamente) pero eso no implica la fiabilidad de la densidad de células endoteliales obtenida por confoscan en los pacientes con distrofia de Fuchs. En el estudio hecho por Mustonen *et al.* en el año 1998, se podía valorar la densidad de células endoteliales por microscopía especular en 8 de 22 ojos con distrofia de Fuchs y había correlación positiva con las densidades obtenidas con el Confoscan ( $r = 0.95$ ) (21).

En la comparación de los resultados obtenidos por ambas pruebas entre pacientes afectados y controles, la densidad de células endoteliales en ojos afectados era menor que la de las córneas normales, este resultado era estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ). Por otro lado, el porcentaje de células hexagonales en los pacientes normales comparado con ambas pruebas en controles era comparable, este número ha disminuido en los pacientes con distrofia de Fuchs pero hay que remarcar que este valor es poco específico y sensible ya que las córneas normales solo tienen un 60% de sus células en forma hexagonal (9,20,28).

En el examen cualitativo realizado mediante confoscan, se han apreciado algunos cambios en las distintas capas de la córnea. En el epitelio, se evidenciaba hiperreflectividad de los límites de las células epiteliales en algunos pacientes, pudiendo ser indicativo de inicio de edema epitelial (14). También se



ha podido valorar el estroma y la presencia de vacuolas de fluido entre las lámelas estromales así como un aumento de reflectividad de los queratocitos en el estroma. Éstos hallazgos fueron descritos previamente en otros estudios (29).

## **Conclusión**

El Confoscan ha demostrado ser más útil en córneas con edema corneal o guttas significativas; también fue superior al microscopio especular en la exploración de guttas en córneas con esta patología. La densidad de células endoteliales fue calculada con microscopía confocal en todos los ojos afectados de la muestra pero no se ha logrado demostrar en este estudio si estos valores son fiables. Sin embargo el microscopio especular sigue siendo una prueba muy útil en pacientes normales y también en algunos pacientes con córneas afectas por ser una prueba más práctica, barata y accesible que la biomicroscopía confocal.

## **Bibliografía**

- 1- Foster CS, Azar DT, Dohlmann CH  
The cornea, scientific foundations and clinical Practice. Fourth edition.  
Lippincott Williams & Wilkins 2005.
- 2- Alaertes ML.  
Aspects de l'endotelium corneen au biomicroscope. Bull soc bel  
Ophthalmol 1959; 122:320
- 3- Bonano JA.  
Identity and regulation of ion transport mechanisms in corneal  
endothelium. Prog Retin Eye Res 2003; 22:69-94
- 4- Yee RW, Matsuda M, Schultz RO, Edelhauser HF.  
Changes in the normal corneal endothelial cellular pattern as a  
function of age. Curr Eye Res 1985; 4:671-678
- 5- Bourne WM  
Morphologic and functional evaluation of the endothelium of  
transplanted human corneas. Trans Am Ophthalmol Soc 1983; 81:403-  
450
- 6- Wilson SE, Bourne WM, O'Brien PC, *et al.*

Endothelial function and aqueous flow rate in patients with Fuchs dystrophy. AM J Ophthalmol 1988; 106:270-278

- 7- McCartney MD, Robertson DP, Wood TU, *et al.*  
ATPase pump site density in human dysfunctional corneal endothelium. Invest Ophthalmol Vis Sci 1987; 28:1955-62
- 8- Eghrari AO, Gottsch JD  
Fuchs' corneal dystrophy. Expert Rev. Ophthalmol 2010; 5(2), 147-159
- 9- Adamis AA, Filatov V, Tripathi BJ, Tripathi RC  
Fuch's endothelial dystrophy of the cornea. Survey of ophthalmology. September 1993; Vol 38 (2).
- 10- Krachmer JH, Purcell JJ, Young CW, Bucher KD.  
Corneal endothelial dystrophy. A study of 64 families. Arch Ophthalmol 1980; 96: 2036-2039
- 11- Rosenblum P, Stark WJ, Maumenee IH, Hirst LW.  
Hereditary Fuchs' dystrophy. Am J Ophthalmol 1980; 90: 455-462
- 12- Magovern M, Beauchamp GR, McTigue JW, Fine BS, Baumiller RC

Inheritance of Fuchs' combined dystrophy. Ophthalmology 1979; 86:  
1897-1923

- 13- Gottsch JD, Bowers AL, Margulies EH *et al.*  
Serial analysis of gene expression in the corneal endothelium of  
Fuchs' dystrophy. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2003; 44, 594-599
- 14- C.Burillon, P.Gain. Endothélium cornéen. Bulletin des sociétés  
d'ophtalmologie de France. Rapport annuel- Numéro special-  
Novembre 2002
- 15- R.I.Barraquer, M C. de Toledo. Distrofias y degeneraciones corneales.  
Espax 2004
- 16- Csaba L, Mártonyi CL.  
Slit lamp examination in cornea. 1997, Mosby year book, 243-268
- 17- Laing R, Leibowitz H, Oak SS, Chang R *et al.*  
Endothelial mosaic in Fuch's dystrophy: A qualitative evaluation with  
specular microscope. Arch ophthalmol Jan 1981; Vol 99.
- 18- Gutthoff RF, Zhivov A, Stachs O.

In vivo confocal microscopy, an inner vision of the cornea – a major review. Clinical and experimental ophthalmology 2009; 37: 100-117

- 19- Erie JC, McLaren JW, Patel SV.  
Confocal microscopy in ophthalmology. Am J Ophthalmol 2009; 148:639-646
- 20- Chiou AG, Kaufman SC, Beuerman RW, Ohta T *et al.*  
Confocal microscopy in cornea guttata and Fuchs' endothelial dystrophy. Br J Ophthalmol. 1999; 83:185–189
- 21- Mustonen RK, McDonald MB, Srivannaboon S, *et al.*  
In vivo confocal microscopy of Fuchs' endothelial dystrophy. Cornea. 1998; 17:493–503
- 22- Kaufman SC, Beuerman RW, Kaufman HE  
Diagnosis of advanced Fuch's endothelial dystrophy with confocal microscope. Am J Ophthalmol 1993; 116 (5): 652-653.
- 23- Patel D, McGhee C.  
Contemporary *in vivo* confocal microscopy of the living human cornea using white light and laser scanning techniques: a major review. Clin and exp ophthalmol 2007; vol 35; 71-88



- 24- Hara M, Morishigi N, Chikama T, Nishida T.  
Comparison of confocal biomicroscopy and non-contact specular  
microscopy for evaluation of the corneal endothelium. *Cornea* 2003;  
vol 22(6):512-515
- 25- Imre L, Nagymihály A.  
Reliability and reproducibility of corneal endothelial image analysis by  
in vivo confocal microscopy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2001;  
239:356-360
- 26- Klais CM, Bühren J, Kohnen T.  
Comparison of endothelial cell count using confocal and contact  
specular microscopy. *Ophthalmologica.* 2003; 217:99-103
- 27- Kitzman A, Winter E, Nau CB, McLaren JW *et al.*  
Comparison of corneal endothelial cell images from a non-contact  
specular microscope and a scanning confocal microscope. *Cornea*  
2005; vol 24 (8):980-984.
- 28- Doughty MJ.

Prevalence of “non-hexagonal” cells in the corneal endothelium of young Caucasian adults and their inter-relationships. Ophthalmic Physiol Opt 1998; 18 (5): 415-22

- 29- Gupcheva CN, Craig JP, Sherwin T, *et al.*  
Differential diagnosis of corneal oedema assisted by in vivo confocal microscopy. Clin Experiment Ophthalmol 2001; 29 (3):133-7